

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-42874

(43)公開日 平成10年(1998)2月17日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 9/12			C 1 2 N 9/12	
C 1 2 Q 1/68		7823-4B	C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 27 頁)

(21)出願番号 特願平8-200446

(22)出願日 平成8年(1996)7月30日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 小松原 秀介

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 北林 雅夫

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 上村 秀喜

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物

(57)【要約】

【課題】核酸の増幅効率が優れた耐熱性DNAポリメラーゼ組成物を提供する。

【解決手段】改変前の3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼに比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第1 DNAポリメラーゼ）および3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%である3' 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第2 DNAポリメラーゼ）を含み、第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼが少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH8.8にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。該組成物を使用することにより長鎖核酸の増幅も可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 改変前の3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0～5%である3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第1 DNAポリメラーゼ）および3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%である3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第2 DNAポリメラーゼ）を含み、第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼが、少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項2】 第2 DNAポリメラーゼの活性が、第1 DNAポリメラーゼの活性よりも小さい請求項1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項3】 第1 DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2 DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位である請求項1記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

【請求項4】 第1 DNAポリメラーゼの3′-5′エキソヌクレアーゼ活性が、改変前の耐熱性DNAポリメラーゼの3′-5′エキソヌクレアーゼ活性に比べて、約1%以下に低下したものである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項5】 第1 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1項記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【請求項6】 第1 DNAポリメラーゼが下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項7】 第1 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3′-5′エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギン酸をアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【請求項8】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項9】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項10】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項11】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項12】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第210番目のアスパラギン酸をアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項13】 第1 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項14】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ

である請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。
作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

【請求項15】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1（EXO1）領域に存在するアミノ酸配列、X₁、DX₂、EX₃、モチーフのうち、X₁、X₂およびX₃の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項16】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【請求項17】 第2 DNAポリメラーゼが、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【請求項18】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

10 【請求項19】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項20】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

20 【請求項21】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項22】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項23】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

30 【請求項24】 第2 DNAポリメラーゼが、配列番号2の第144番目のスレオニンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼである請求項1記載のDNAポリメラーゼ組成物。

【請求項25】 下記第1 DNAポリメラーゼおよび下記第2 DNAポリメラーゼを含むことを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物。

第1 DNAポリメラーゼ：

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

50 アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタ

ミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギンをアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

第2 DNAポリメラーゼ:

作用: DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも120塩基/秒

熱安定性: pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75℃

分子量: 88~90KDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列

または

作用: DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100~30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも120塩基/秒

熱安定性: pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75℃

分子量: 88~90KDa

アミノ酸配列: 配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【請求項26】 DNAを鋳型とし、プライマー、dNTPおよび請求項1~25のいずれか1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物を含む試薬を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅法。

【請求項27】 プライマーが2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である請求項26記載の核酸増幅法。

【請求項28】 加熱および冷却を繰り返す請求項26記載の核酸増幅法。

【請求項29】 請求項1~25項のいずれか1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオン、プライマー、dNTPおよび緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【請求項30】 請求項1~25項のいずれか1項記載の核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン、1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTP、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む核酸増幅用試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物および該組成物を含む核酸増幅用試薬および該試薬を用いる核酸増幅法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)等の核酸を増幅する技術に用いる耐熱性DNAポリメラーゼに関する研究が多くなされている。PCR反応に用いられる耐熱性DNAポリメラーゼは、主としてサーマス・サーモフィラス(*Thermophilus*)由来のDNAポリメラーゼ(Tthポリメラーゼ)やサーマス・アクアチカス(*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ(Taqポリメラーゼ)などが用いられてきた。また、超好熱始原菌由来のDNAポリメラーゼ、たとえばパイロコッカス・フリオサス(*Pyrococcus furiosus*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Pfuポリメラーゼ、WO92/09689、特開平5-328969公報)、サーマス・リトラリス(*Thermococcus litoralis*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(Tliポリメラーゼ、特開平6-7160号公報)などが知られている。

【0003】本発明者らは熱安定性やDNA合成速度に優れたパイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来の耐熱性DNAポリメラーゼ(KODポリメラーゼ、特開平7-298879号公報)を見出した。さらに、本発明者らはパイロコッカス(*Pyrococcus*) s p. KOD1由来のポリメラーゼのDNAの合成速度や熱安定性を保持したまま、改変前の該酵素に比べて3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を少なくとも5%以下に低下させた改変酵素を作り出すことに成功した。該酵素は、DNA合成速度が少なくとも30塩基/秒であって、pH8.8 (25℃での測定値、95℃にてpHを測定することは困難である。)にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる耐熱性DNAポリメラーゼであって、改変前の酵素に比べて、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が少なくとも5%以下に低下した酵素である。該酵素を用いることにより、改変前の酵素を用いるよりも増幅効率が上昇することも見出した。

【0004】一方、長鎖核酸を増幅する方法の1つとして、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を欠くTaqポリメラーゼ(KlenTaq-278)と3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼまたはこれらの変異酵素を混合したDNAポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報告されている(Barns, W.M. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2216-2220)。また、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示さないTthポリメラーゼと3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を示すPfuポリメラーゼまたはTliポリメラーゼ、サーモトガ・マリチマ(*Thermotoga maritima*)由来の耐熱性DNAポリメラーゼを混合したポリメラーゼ組成物を用いて、PCRを行う方法が報

告されている（特開平 8-38198号公報）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これらの組成物は1種類のDNAポリメラーゼを用いる場合に比べて、増幅効率は改善されるものの、熱安定性やDNA合成速度の異なる2種類のDNAポリメラーゼを用いており、決して充分な増幅効率とはいえず、より増幅効率が優れた方法が待ち望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】そこで、本発明者らは鋭意検討した結果、核酸増幅用のDNAポリメラーゼ組成物であって、第1 DNAポリメラーゼと、ポリメラーゼ活性単位で測定すると第1 DNAポリメラーゼよりも少量の第2 DNAポリメラーゼの組み合わせからなり、熱安定性およびDNA合成速度がほぼ等しいDNAポリメラーゼ、具体的には前記第1 DNAポリメラーゼが天然に存在する該酵素に比べて、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が0~5%である改変された耐熱性DNAポリメラーゼであり、そして前記第2 DNAポリメラーゼが天然に存在する3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ、または天然に存在する該酵素に比べて、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性が100~6%である改変されたDNAポリメラーゼよりなる群から選択されるDNAポリメラーゼであるDNAポリメラーゼ組成物を用いることにより、増幅効率の優れたPCRが行えることを見出し、本発明に到達した。

【0007】すなわち、本発明は改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第1 DNAポリメラーゼ）および3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100~6%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼ（第2 DNAポリメラーゼ）を含み、第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼが、少なくとも30塩基/秒であるDNA合成速度、pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる熱安定性を有することを特徴とする核酸増幅用DNAポリメラーゼ組成物である。

【0008】また、本発明はDNAを鋳型とし、プライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成することを特徴とする核酸増幅法である。

【0009】さらに、本発明は1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、2価イオン、1価イオンおよび緩衝液を含む核酸

増幅用試薬である。

【0010】

【発明の実施態様】

【0011】本発明の第1 DNAポリメラーゼは、改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、0~5%、好ましくは1%以下に低下した3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素である。

【0012】このような第1 DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の141番目のアスパラギン酸と143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した酵素、配列番号2の210番目のアスパラギン酸をアスパラギン酸に置換した酵素、配列番号2の311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した酵素などがあげられる。また、配列番号142番目のイソロイシンをアルギニンに置換した酵素も含まれる。

【0013】本発明の第1 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

【0014】本発明の第1 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0~5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8（25℃での測定値）にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88~90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列の第141、142、143、210および311番目のアミノ酸の少なくとも1つを他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0015】本発明の第1 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNA

ポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、0～5%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2の第141番目のアスパラギン酸をアラニンに、第142番目のイソロイシンをアルギニンに、第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第141番目のアスパラギン酸と第143番目のグルタミン酸をアラニンに、第210番目のアスパラギン酸をアスパラギン酸に、第311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換したアミノ酸配列

【0016】本発明の第2 DNAポリメラーゼは、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼまたは改変前の3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼに比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼである。このような第2 DNAポリメラーゼとしては、アミノ酸配列が配列番号2に記載のアミノ酸配列を有する酵素または配列番号2に記載のアミノ酸配列の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を有する酵素がある。その一例としては、配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミンまたはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換した酵素などがあげられる。

【0017】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0018】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' -

5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2に記載のアミノ酸配列のエキソ1 (EXO1) 領域に存在するアミノ酸配列、X₁、DX₂、EX₃、モチーフのうち、X₁、X₂、およびX₃の少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

なお、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性をもつDNAポリメラーゼのアミノ酸配列中には、このエキソヌクレアーゼに関して高度に保存されたアミノ酸領域が知られている (EXO I, EXO II, EXO III, 図4)。エキソI (EXO1) 領域にはX₁、DX₂、EX₃、モチーフが存在し、これらのアミノ酸、D (アスパラギン酸) とE (グルタミン酸) はエキソヌクレアーゼ活性に必須であることが知られている。

【0019】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

アミノ酸配列：配列番号2の第140、142および144番目のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列

【0020】本発明の第2 DNAポリメラーゼとしては、下記理化学的性質を有する改変された耐熱性DNAポリメラーゼがある。

作用：DNA合成活性を有し、改変前の酵素に比べて、100～6%、好ましくは90～30%である3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

DNA合成速度：少なくとも30塩基/秒

熱安定性：pH8.8 (25℃での測定値) にて95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度：約75℃

分子量：88～90KDa

アミノ酸配列：配列番号2の第142番目のイソロイシンをアスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、またはリジンに置換したアミノ酸配列、または第144番目のスレオニンをバリンに置換したアミノ酸配列

【0021】第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼのDNA合成速度は少なくとも30塩基/

秒、好ましくは100～120塩基/秒であって、pH 8.8(25℃での測定値)にて95℃、6時間の処理で60%以上の活性を保持できる耐熱性DNAポリメラーゼである。本発明の第1 DNAポリメラーゼおよび第2 DNAポリメラーゼは、KODポリメラーゼまたは該酵素の変異体であることが好ましい。

【0022】本発明では、第2 DNAポリメラーゼの活性が、第1 DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1 DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2 DNAポリメラーゼが0.02～0.1単位であることが好ましい。

【0023】これらの改変された酵素を製造する方法としては、例えば天然型KODポリメラーゼをコードする遺伝子に変異を導入して、蛋白工学的手法により、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する方法がある。

【0024】変異を導入するためのKODポリメラーゼをコードする遺伝子は特に限定されないが、本発明の一実施態様は、パイロコッカス(Pyrococcus) s p. KO D由来の配列表・配列番号3に記載の遺伝子を用いた。

【0025】本発明の別な実施態様は、配列番号1に記載されたアミノ酸配列をコードする遺伝子に変異を導入して、天然型KODポリメラーゼに比べて3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が低下した新規な酵素を製造する。

【0026】天然型KODポリメラーゼ遺伝子に変異を導入する方法は、既知のいかなる方法でも用いることができる。例えば天然型KODポリメラーゼ遺伝子DNAと変異源となる薬剤を接触させる方法や紫外線照射による方法などから、蛋白工学的な手法、例えばPCR法や部位特異的変異などの方法を用いることができる。また、遺伝子修復機構が欠損されたため、高頻度に遺伝子に変異が起こる大腸菌を用いた in vivoでの変異の導入も可能である。本発明で使用したカメレオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)とは、(1) 目的とする遺伝子を挿入したプラスミドを変性させ、該プラスミドに変異プライマーと選択プライマーとアニーリングさせる。(2) 次にDNAポリメラーゼでDNA合成を行った後、ライゲースにてライゲーション反応を行う。(3) 選択プライマー中に存在しないが、鋳型となるプラスミドに存在する制限酵素でプラスミドを切断し、変異の挿入されていないDNAを切断する。(4) 次に残されたプラスミドで大腸菌を形質転換する。(5) 形質転換体から変異プラスミドを調製し、(3),(4)を繰り返す、目的とする変異の挿入されたプラスミドを得る方法である。

【0027】上記のようにして得られた改変ポリメラーゼ遺伝子を、例えばpLED-M1、pBluescriptなどのベクターに挿入し、例えば大腸菌に形質転

換した後、アンピシリン等の薬剤を含む寒天培地に塗布し、コロニーを形成させる。コロニーを栄養培地、例えばLB培地や2×YT培地に接種し、37℃で12～20時間培養した後、菌体を破碎して粗酵素液を抽出する。菌体を破碎する方法は、公知のいかなる手法を用いてもよく、例えば超音波処理やガラスビール破碎のような物理的破碎法やリゾチームのような溶菌酵素を用いることができる。この粗酵素を熱処理、例えば80℃、30分間処理し、宿主由来のポリメラーゼを失活させ、DNAポリメラーゼ活性を測定する。次に3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を測定し、両者の活性比率を天然型KODポリメラーゼと比較することにより、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の低下した酵素をスクリーニングすることができる。

【0028】上記方法により選抜された菌株から精製DNAポリメラーゼを取得する方法は、公知のいかなる手法を用いても良く、例えば下記方法がある。栄養培地に培養して得られた菌体を回収した後、酵素的または物理的破碎法により破碎抽出して粗酵素液を得る。得られた粗酵素抽出液から熱処理、例えば80℃、30分間処理し、その後、硫酸沈殿によりKODポリメラーゼ画分を回収する。この粗酵素液をセファデックスG-25(ファルマシア・バイオテック)ゲル濾過等の方法により脱塩を行うことができる。この操作の後、Qセファロース、ヘパリンセファロースなどのカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。この精製酵素標品はSDS-PAGEによってほぼ単一のバンドを示す程度に純化される。

【0029】本発明において、DNA合成活性とは鋳型DNAにアニールされたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの3'-ヒドロキシル基にデオキシリボヌクレオチド5'-トリホスフェートのα-ホスフェートを共有結合せしめることにより、デオキシリボ核酸にデオキシリボヌクレオチド5'-モノホスフェートを鋳型依存的に導入する反応を触媒する活性をいう。

【0030】その活性測定法は、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行う。本発明では、下記A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75℃で10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μl、D液100μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンター(バックカード社製)で計測し、鋳型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定する。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とする。

13

A: 40mM	Tris-HCl (pH7.5)
16mM	塩化マグネシウム
15mM	ジチオスレイトール
100μg/ml	BSA
B: 2μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C: 1.5mM	dNTP (250cpm/pmol [³ H] dTTP)
D: 20%	トリクロロ酢酸 (2mMピロリン酸ナトリウム)
E: 1μg/μl	キャリアーDNA

14

【0031】本発明において、3' - 5' エキソヌクレアーゼ活性とは、DNAの3' 末端領域を切除し、5' -モノヌクレオチドを遊離する活性をいう。その活性測定法は、50μlの反応液 (120mM Tris-HCl (pH8.8 at 25°C), 10mM KCl, 6mM 硫酸アンモニウム, 1mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 5μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA) を1.5mlのエッペンチューブに注し、DNAポリメラーゼを加える。75°Cで10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50μl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合する。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離する。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター (バックード社製) で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定する。

【0032】本発明において、DNA合成速度とは、単位時間当たりのDNAの合成数をいう。その測定法はDNAポリメラーゼの反応液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム、7.5mM ジチオスレイトール、100μg/ml BSA, 0.1mM dNTP, 0.2μCi [α -³²P] dCTP) を、プライマーをアニーリングさせたM13mp181本鎖DNAと75°Cで反応させる。反応停止は等量の反応停止液 (50mM 水酸化ナトリウム、10mM EDTA, 5% フィコール、0.05% プロモフェノールブルー) を加えることにより行う。上記反応にて合成されたDNAをアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行う。DNAサイズマーカーとしてはラベルしたλ/HindIIIを用いる。このマーカーのバンドを指標として合成されたDNAのサイズを測定することによって、DNA合成速度を求める。

【0033】本発明において、熱安定性とは、pH8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理での残存活性を意味する。

【0034】本発明の改変前の耐熱性DNAポリメラーゼは、鹿児島県種子島にて単離した超好熱始菌の1種であるパイロコッカス (Pyrococcus) s p. KOD由来の酵素である。該酵素を生産するKODの菌学的性質は、特開平7-298879号公報に記載される。該酵素は上記菌株を培養して生産される。該酵素は下記理化学的性質を有する。

作用: DNA合成活性を有し、3' - 5' エキソヌクレ

アーゼ活性を有する。

DNA合成速度: 少なくとも120塩基/秒

熱安定性: pH8.8 (25°Cでの測定値) にて95°C、6時間の処理で60%以上の残存活性を保持することができる。

至適温度: 約75°C

分子量: 88~90KDa

アミノ酸配列: 配列番号2に記載のアミノ酸配列

【0035】本発明の核酸増幅法では、上記DNAポリメラーゼ組成物を使用して、DNAを鋳型とし、プライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を反応させて、プライマーを伸長して、DNAプライマー伸長物を合成する方法である。

【0036】本発明の核酸増幅法の1種であるPCR法では、まず、試料中の核酸、特に長鎖核酸が2本鎖である場合には熱により変性させ、1本鎖とする。長鎖核酸が不完全な鎖分離をすれば、プライマーのアニーリングおよび伸長反応を妨げるであろう。次いで該1本鎖を鋳型として該鋳型に相補的なプライマー、好ましくは1方が他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーおよびdNTPを本発明のDNAポリメラーゼ組成物を用いてPCR反応液中にて反応させる。

【0037】反応温度は、2段階の温度サイクルを使用し、増幅される核酸が変性される高温と変性された核酸にプライマーがアニールしてプライマー伸長が起こる低温とを交互に繰り返す。通常、94°Cで0.5~1分間 → 68°Cで0.5~10分間を25~40回繰り返す。2つのプライマーは鋳型核酸配列の反対の末端にアニールし、そして各プライマーの伸長生成物が鋳型核酸配列の相補的なコピーであり、かつ、その相補体から分離された時に他方のプライマーにハイブリダイズすることのできるような方向で鋳型核酸にアニールする。反応時間は、伸長反応が鎖の合成を完結するに十分な時間であることが好ましい。20kbより長い核酸の増幅には、少なくとも10~20分間のアニーリングおよび伸長時間が好ましい。

【0038】長鎖核酸は増幅の間に分解に対して保護されることが好ましく、例えばグリセロール、ジメチルスルホキシド (DMSO) などを使用する。

【0039】誤って取り込まれたヌクレオチドの存在は、鎖の合成を早々と終わらせ、次の回の増幅に向かう鋳型鎖の数を減少させ、長鎖核酸の増幅効率を低下させ

50

てします。しかしながら、本発明ではDNAポリメラーゼ活性に加えて、反応液中に少量の3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が存在することにより、プライマー伸長生成物の合成の間に誤った取込まれたヌクレオチドを除去し、なお、優勢的なポリメラーゼ活性により完全な鎖合成を可能とする。

【0040】反応緩衝液のpHと組成、塩（2価イオンおよび1価イオン）ならびにプライマーの設計は、長鎖核酸の増幅効率にとって重要である。PCR試薬の調製は、通常、変性段階前の室温で行うから、別なプライマーや一部の相同な核酸配列へのプライマーの結合を引き起こすことがある。この非特異的なプライマーの結合からも伸長生成物が形成されると、長鎖生成物の増幅効率を減少させることになる。このような特異的結合を防ぐためには、高温になってから、酵素を添加するなどのいわゆるホットスタート法が好ましい。

【0041】本発明のDNAポリメラーゼは、その活性を維持するために、2価イオン、例えばマグネシウムイオンおよび1価イオン、例えばアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオンを共存させることが好ましい。また、核酸増幅用反応液には、緩衝液およびこれらのイオンを含むとともに、BSA、非イオン界面活性剤、例えばTriton X-100および緩衝液が存在していてもよい。

【0042】本発明の核酸増幅用試薬は、1方のプライマーが他方のプライマーのDNA伸長生成物に相補的である2種のプライマー、dNTPおよび上記DNAポリメラーゼ組成物、マグネシウムイオンおよびアンモニウムイオンおよび/またはカリウムイオン、BSAおよび非イオン界面活性剤および緩衝液を含む。本発明では、第2 DNAポリメラーゼの活性は、第1 DNAポリメラーゼの活性よりも小さいことが好ましく、第1 DNAポリメラーゼ2.5単位につき、第2 DNAポリメラーゼが0.02~0.1単位であることが好ましい。本発明の試薬には必要により、補助溶解剤、例えばグリセリン、DMSO、ポリエチレングリコールなどを含んでいてもよい。

【0043】緩衝液としては、Tris緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（トリシン緩衝液）、N-ビス（ヒドロキシエチル）グリシン（バイシン緩衝液）などが使用される。最適の緩衝液およびpHは使用するDNAポリメラーゼに依存する。本発明ではKODポリメラーゼおよび該酵素の変異体を使用する場合は、pH7.5~9.2（25℃において、10mM~50mM、好ましくは20~120mMである。2価カチオンはマグネシウムイオンが好ましく、塩化マグネシウムなどが使用される。その濃度は1~2mMであることが好ましい。1価カチオンはアンモニウムイオンまたはカリウムイオンが好ましく、硫酸アンモニウム、グルタミン酸カリウム、酢酸カリウムなどが使用される。

それらの濃度は2~50mMであることが好ましい。プライマーは2種のオリゴヌクレオチドであって、1方は他方のDNA伸長生成物に相補的であるプライマーであることが好ましい。その濃度は、0.2~1μMであることが好ましい。

【0044】次に、実施例を用いて本発明を詳細に説明する。

参考例1

超好熱始原菌KOD由来のDNAポリメラーゼ遺伝子のクローニング

鹿児島県子宝島にて単離した超好熱始原菌KOD1株を95℃にて培養後、菌体を回収した。得られた菌体から常法に従い、超好熱始原菌KOD株の染色体DNAを調製した。バイロコッカス・フリオサス（*Pyrococcus furiosus*）由来のDNAポリメラーゼ（Pfuポリメラーゼ）の保存領域アミノ酸配列に基づき、2種のプライマー（5'-GGATTAGTATAGTGCCAATGGSSGGCGA-3' および5'-GAGGCGAGAAGTTTATTCGAGCTT-3'）を合成した。この2種のプライマーを使用し、調製したDNAを鋳型として、PCR反応を行った。

【0045】PCR増幅DNA断片の塩基配列を決定し、アミノ酸配列を決定した後、この増幅DNA断片をプローブとして、KOD1株染色体DNA制限酵素処理産物に対してサザンハイブリダイゼーションを行い、DNAポリメラーゼをコードする断片のサイズを求めた（約4~7Kbp）。さらに、この大きさのDNA断片をアガロースゲルから回収し、プラスミドpBS（ストラタジーン社製）に挿入し、これらの混合物より大腸菌（*E. coli* JM109）を形質転換して、ライブラリーを作製した。サザンハイブリダイゼーションに使用したプローブを用いて、コロニーハイブリダイゼーションを行い、上記ライブラリーから、KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子を含有すると考えられるクローン株（*E. coli* JM109/pSBKOD1）を取得した。

【0046】取得したクローン株、（*E. coli* JM109/pSBKOD1）よりプラスミド、pSBKOD1を回収し、常法に従い、塩基配列を決定した。さらに求められた塩基配列からアミノ酸配列を推定した。KOD1株由来のDNAポリメラーゼ遺伝子は5010塩基からなり、1670個のアミノ酸がコードされていた（配列番号1）。

【0047】完全なポリメラーゼ遺伝子を作成するため、2箇所の介在配列（1374~2453bp：2708~4316bp）をPCR融合法により取り除いた。PCR融合法では、クローン株より回収したプラスミドを鋳型に、3組のプライマーを組み合わせて、各々PCRを行い、介在配列を除いた3断片を増幅した。この際、PCRに用いるプライマーは、他の断片と結合する側に結合相手と同様な配列がくるように設計した。また、両端には別々な制限酵素サイト（N末端側：EcoRV、C末端側：BamHI）が創出されるように設計

した。次いで、PCR増幅断片中、構造上中央に位置する断片と、N末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。また、同様に構造上、中央に位置する断片と、C末端側に位置する断片を混合し、PCRを各々の断片をプライマーとして行った。このようにして得られた2種の断片を用いて再度PCRを行い、介在配列が取り除かれ、N末端にEcoRV、C末端にBamHIサイトを有するKOD1株由来のDNAポリメラーゼをコードする完全な形の遺伝子断片を取得した。更に、同遺伝子をT7プロモーターで誘導可能な発現ベクター、pET-8cのNcoI/BamHIサイト、先に創出した制限酵素サイトを利用し、サブクローニングして、組換え発現ベクター(pET-pol)を得た。なお、E. coli BL21(DE3)/pET-polは、生命工学工業研究所へ寄託されている(FERM BP-5513)。

【0048】参考例2

KODポリメラーゼ遺伝子のサブクローニング

耐熱性DNAポリメラーゼを改変するために、プラスミドpET-polからKODポリメラーゼ遺伝子を切り出し、pBluescriptにサブクローニングした。すなわちpET-polを制限酵素、XbaIとBamHI(東洋紡製)で切断し、約2.3kbのKODポリメラーゼ遺伝子を切り出した。次にこのDNA断片をライゲーションキット(東洋紡製 Ligation high)を用いて、XbaIとBamHIで切断したプラスミドpBluescript SK(-)と連結した。次に、市販のコンピテントセル(東洋紡製 competent high JM109)を用いて形質転換を行った。100μg/mlのアンピシリンを含んだLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、ギブコ社製)で35℃で16時間培養し、得られたコロニーからプラスミドを調製した。さらに、部分塩基配列を確認してKODポリメラーゼ遺伝子を含むプラスミドpKOD1を得た。

【0049】参考例3

改変型遺伝子(DA)の作製及び改変型耐熱性DNAポ*

(試薬)

A:	40mM	Tris-HCl (pH7.5)
	16mM	塩化マグネシウム
	15mM	ジチオスレイトール
	100μg/ml	BSA
B:	2μg/μl	活性化仔牛胸腺DNA
C:	1.5mM	dNTP (250cpm/pmol [³ H] dTTP)
D:	20%	トリクロロ酢酸 (2mMピロリン酸ナトリウム)
E:	1μg/μl	キャリアーDNA

【0052】(方法) A液25μl、B液およびC液各5μlおよび滅菌水10μlをエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合した後、上記酵素液5μlを加えて75℃で10分間反応する。その後、氷冷し、E液50μ

*リメラーゼ(DA)の精製

参考例2で得られたプラスミドpKOD1を用いて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した(pKODDA)。作製はカメレオン site-directed mutagenesisキット(ストラタジーン社製)を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号7に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読で行った。得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換し、JM109(pKODDA)を得た。

【0050】滅菌処理した100μg/mlのアンピシリンを含んだTB培地(MolecularCloning, p. A. 2に記載)6Lを10Lジャーファーメンターに分注した。この培地に予め100μg/mlのアンピシリンを含んだ50mlのLB培地(1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、ギブコ社製)で30℃、16時間培養した大腸菌JM109(pKODDA)(500ml坂口フラスコ使用)を接種し、35℃で12時間通気攪拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400mlの破碎緩衝液(10mMTris-HCl(pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール、1mM EDTA)に懸濁後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を85℃にて30分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンイミンを用いた除核酸処理、硫酸分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液(50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM 塩化カリウム、1mM ジチオスレイトール、0.1% Tween20, 0.1%ノニデットP40, 50%グリセリン)に置換し、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA)を得た。上記精製工程のDNAポリメラーゼ活性測定は以下の操作で行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0051】

1、D液100μlを加えて、攪拌後、さらに10分間氷冷する。この液をガラスフィルター(ワットマンGF/Cフィルター)で濾過し、D液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーション

カウンター（パッカード社製）で計測し、鋳型DNAへのヌクレオチドの取り込みを測定した。酵素活性の1単位はこの条件下で30分あたり10nモルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0053】参考例4

変異体（EA）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODEA）。選択プライマーとしては配列番号5に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号8に記載のプライマーを用いた。更に参考例3同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（EA）を得た。

【0054】参考例5

変異体（DEA）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの141番目のアスパラギン酸及び143番目のグルタミン酸をアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODDEA）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号6に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DEA）を得た。

【0055】参考例6

変異体（ND）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて、配列表2に記載のKODポリメラーゼの210番目のアスパラギン酸をアスパラギン酸に置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODND）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号9に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（ND）を得た。

【0056】参考例7

変異体（YF）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例3と同様の方法にて配列表2に記載のKODポリメラーゼの311番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した改変型耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を持つプラスミドを作製した（pKODYF）。選択プライマーとしては配列番号4に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号10に記載のプライマーを用いた。更に参考例3と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（YF）を得た。

【0057】参考例8

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DA、EA、DEA、NDおよびYF）のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ（東洋紡製）を用いた。50μlの反応液（120mM Tris-HCl（pH8.8 at 25℃）、10mM KCl、6mM 硫酸アンモニウム、1mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、5μg トリチウムラベルされた大腸菌DNA）を1.5mlのエッペンチューブに注し、DNAポリメラーゼをそれぞれ25単位、50単位、100単位加えた。なお、天然型のKODポリメラーゼは0.25単位、0.5単位、1単位用いた。75℃で10分間反応させた後、氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして、0.1%のBSAを50μl加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカード社製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。図1に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。この結果では改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DEA、DA、EA）の3種類のポリメラーゼはエキソヌクレアーゼ活性が検出できなかった。また、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（ND）は天然型のKODポリメラーゼの約0.1%、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（YF）は約0.01%のエキソヌクレアーゼ活性を示した。

30 【0058】参考例9

熱安定性の確認

参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（DA、EA、DEA、NDおよびYF）の熱安定性を以下の方法にて測定した。精製した改変型DNAポリメラーゼ5単位を100μlの緩衝液（20mM Tris-HCl pH8.8 at 25℃、10mM 塩化カリウム、10mM 硫酸アンモニウム、2mM 硫酸マグネシウム、0.1% Triton X-100、0.1mg/ml BSA、5mM 2-メルカプトエタノール）に混合し、95℃でブレインキュベートとした。この混合液から経時的に試料を採取し、参考例3記載の方法にてポリメラーゼ活性を測定した。比較として、Taqポリメラーゼ（東洋紡製）および天然型KODポリメラーゼ（東洋紡製）も同様の操作を行った。図2に示したように、いずれの改変型耐熱性DNAポリメラーゼも天然型KODポリメラーゼと同様に、95℃、6時間の処理で60%以上の残存活性を示した。それに対してTaqポリメラーゼは15%以下の残存活性であった。

【0059】参考例10

DNA合成速度測定

50 参考例3～7で得られた改変型耐熱性DNAポリメラー

ゼ (DA, EA, DEA, ND および YF) の DNA 合成速度を以下の方法で測定した。精製した改変型 DNA ポリメラーゼ 1 単位を 10 μ l の反応液 (20mM Tris-HCl (pH7.5), 8mM 塩化マグネシウム, 7.5mM ジチオスレイトール, 100 μ g/ml BSA, 0.1mM dNTP, 0.2 μ Ci [32 P]dCTP) で 0.2 μ g の配列番号 15 のプライマーをアニーリングさせた M13mp181 本鎖 DNA と 75 $^{\circ}$ C で 20 秒、40 秒、60 秒間反応させた。反応停止は等量の反応停止液 (50mM 水酸化ナトリウム, 10mM EDTA, 5% フィコール, 0.05% プロモフェノールブルー) を加えることにより行った。比較として Taq ポリメラーゼ (東洋紡製) および天然型の KOD ポリメラーゼ (東洋紡製) も同様の操作を行った。

【0060】上記反応にて合成された DNA をアルカリアガロースゲル電気泳動にて分画した後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーを行った。DNA サイズマーカーとしてはラベルした λ /HindIII を用いた。このマーカーのバンドを指標として合成された DNA のサイズを測定することによって、DNA 合成速度を求めた。その結果、いずれの改変型ポリメラーゼも天然型の KOD ポリメラーゼと同様に、約 120 塩基/秒の合成速度を有していた。それに対して Taq ポリメラーゼは約 60 塩基/秒の合成速度であった。

【0061】参考例 11

改変型遺伝子 (I N) の作製および改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

参考例 2 で得られたプラスミド pKOD1 を用いて、KOD ポリメラーゼの EXO1 領域に存在する X₁ DX₂ EX₃ モチーフのうち、X₂ のイソロイシンをアスパラギンに置換した改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子をもつプラスミドを作製した (pKODIN)。作製は*

(試薬)

A:	40mM	Tris-HCl (pH7.5)
	16mM	塩化マグネシウム
	15mM	ジチオスレイトール
	100 μ g/ml	BSA
B:	2 μ g/ μ l	活性化仔牛胸腺 DNA
C:	1.5mM	dNTP (250 cpm/pmol [3 H] dTTP)
D:	20%	トリクロロ酢酸 (2mM ピロリン酸ナトリウム)
E:	1 μ g/ μ l	キャリア DNA

【0064】(方法) A 液 25 μ l、B 液および C 液各 5 μ l および滅菌水 10 μ l をエッペンドルフチューブに加えて攪拌混合後、上記熱処理液 5 μ l を加えて 75 $^{\circ}$ C で 10 分間反応する。その後、氷冷し、E 液 50 μ l、D 液 100 μ l を加えて、攪拌後さらに 10 分間氷冷する。この液をガラスフィルター (ワットマン GF/C フィルター) で濾過し、D 液及びエタノールで充分洗浄し、フィルターの放射活性を液体シンチレーションカウンタ (バックード社製) で計測し、鋳型 DNA へのヌクレオチドの取り込みを測定した酵素活性の 1 単位は

*カメレオン site-directed mutagenesis キット (ストラタジーン社製) を用いた。方法は取扱説明書に準じて行った。選択プライマーとしては配列番号 14 に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号 15 に記載のプライマーを用いた。なお、変異体の確認は塩基配列の解読で行った。得られたプラスミドで大腸菌 JM109 を形質転換し、JM109 (pKODIN) を得た。【0062】滅菌処理した 100 μ g/ml のアンピシリンを含んだ TB 培地 (Molecular Cloning, p. A. 2 に記載) 6 L を 10 L ジャーファーメンターに分注した。この培地に予め 100 μ g/ml のアンピシリンを含んだ 50 ml の LB 培地 (1% バクトトリプトン、0.5% イーストエキストラクト、0.5% 塩化ナトリウム、ギブコ社製) で 30 $^{\circ}$ C、16 時間培養した大腸菌 JM109 (pKODIN) (500 ml 坂口フラスコ使用) を接種し、35 $^{\circ}$ C で 12 時間通気攪拌培養した。培養液より菌体を遠心分離により回収し、400 ml の破碎緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH8.0), 80mM KCl, 5mM 2-メルカプトエタノール, 1mM EDTA) に懸濁後、超音波処理によって菌体を破碎し、細胞破碎液を得た。次に、細胞破碎液を 85 $^{\circ}$ C にて 30 分処理した後、遠心分離にて不溶性画分を除去した。さらにポリエチレンジオキサンを用いた除核酸処理、硫酸分画、ヘパリンセファロースクロマトグラフィーを行い、最後に保存緩衝液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 50mM 塩化カリウム, 1mM ジチオスレイトール, 0.1% Tween20, 0.1% ノニデット P40, 50% グリセリン) に置換し、改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼ (I N) を得た。上記精製工程の DNA ポリメラーゼ活性測定は以下の操作で行った。また、酵素活性が高い場合には、保存緩衝液でサンプルを希釈して測定を行った。

【0063】

この条件下で 30 分あたり 10 n モルのヌクレオチドを酸不溶性画分に取り込む酵素量とした。

【0065】参考例 12

変異体 (I E) 遺伝子の作製および改変型耐熱性 DNA ポリメラーゼの精製

参考例 11 と同様の方法にて、KOD ポリメラーゼの EXO1 領域に存在する X₁ DX₂ EX₃ モチーフのうち、X₂ のイソロイシンをグルタミン酸に置換した耐熱性 DNA ポリメラーゼ遺伝子を作製した (pKODIE)。選択プライマーとしては配列番号 14 に記載のプラ

イマーを使用した。変異プライマーは配列番号16に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（IE）を得た。

【0066】参考例13

変異体（IQ）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをグルタミンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した（pKODIQ）。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号17に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（IQ）を得た。

【0067】参考例14

変異体（ID）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にて、KODポリメラーゼのEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₂のイソロイシンをアスパラギン酸に置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した（pKODID）。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号18に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（ID）を得た。

【0068】参考例15

変異体（TV）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのうち、X₃のチロシンをバリンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した（pKODTV）。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号19に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（TV）を得た。

【0069】参考例16

変異体（IK）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのXのうち、X₂のイソロイシンをリジンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した（pKODIK）。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号21に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（IK）を得た。

【0070】参考例17

変異体（IR）遺伝子の作製及び改変型耐熱性DNAポリメラーゼの精製

参考例11と同様の方法にてEXO1領域に存在するX₁DX₂EX₃モチーフのXのうち、X₂のイソロイシンをアルギニンに置換した耐熱性DNAポリメラーゼ遺伝子を作製した（pKODIR）。選択プライマーとしては配列番号14に記載のプライマーを使用した。変異プライマーは配列番号20に記載のプライマーを用いた。更に、参考例11と同様の精製方法にて改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（IR）を得た。

【0071】参考例18

改変型耐熱性DNAポリメラーゼのエキソヌクレアーゼ活性の確認

上記参考例11～17で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼ（IN、IE、IQ、ID、YV、IKおよびIR）のエキソヌクレアーゼ活性を以下の方法にて測定した。対照として、天然型のKODポリメラーゼ（東洋紡製）を用いた。50μlの反応液（120mM Tris-HCl（pH8.8 at 25℃）、10mM KCl、6mM 硫酸アンモニウム、1mM MgCl₂、0.1% Triton X-100、0.001% BSA、5μgトリチウムラベルされた大腸菌DNA）を1.5mlのエッペンチューブに注し、上記DNAポリメラーゼをそれぞれ0.5ユニット、1ユニット、1.5ユニット加えて、75℃で10分間反応させた。氷冷によって反応を停止し、次にキャリアーとして0.1%のBSAを50ml加え、さらに10%のトリクロロ酢酸、2%ピロリン酸ナトリウム溶液を100μl加え混合した。氷上で15分放置した後、12,000回転で10分間遠心し沈殿を分離した。上清100μlの放射活性を液体シンチレーションカウンター（パッカード社製）で計測し、酸可溶性画分に遊離したヌクレオチド量を測定した。

【0072】図5に各DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNAの分解率を示した。更に天然型のKODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比を図6に示した。このように本発明によれば様々な強さの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼが得られることを示した。天然型のKODポリメラーゼの3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対して、INは約95%、IEは約76%、IQは約64%、IDは約52%、TVは約48%、IKは約30%、IRは約0%の同活性を有していた。

【0073】参考例11

改変型DNAポリメラーゼのPCRでのDNA合成の正確性の測定

天然型のKODポリメラーゼ、改変型耐熱性DNAポリメラーゼIE、ID、IK、IRおよびTaqポリメラーゼについて、PCRでのDNA合成の正確性を以下の方法にて測定した。プラスミドpUR288（Current

Protocols in Molecular Biology 1.5.6に記載)を制限酵素 ScaI で切断した。このプラスミドを1 ng用いてPCRを行った。反応終了後、5 μ lの反応液についてアガロースゲル電気泳動を行い、約5.3 kbのターゲットの増幅を確認した。残りの反応液をフェノール/クロロホルム処理し、次にエタノール沈殿を行った。沈殿を乾燥後50 μ lのHighバッファー(50mM Tris-HCl (pH7.5), 100mM NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT)に溶解した。さらに制限酵素 ScaI (東洋紡製)を10ユニット加えて、37℃で16時間反応させた。アガロースゲル電気泳動にて目的の増幅産物を分離し、その部分のアガロースを切り出した。このアガロースからジーンクリーン2 (Bio101社製)を用いてDNAを精製した。精製したDNA 10 ngを10 μ lになるようにTEバッファー(10mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA)で希釈し、ライゲーションキット(東洋紡製 Ligation high)の反応液10 μ lを加えて16℃で30分間反応した。次に市販のコンピテントセル(東洋紡製 competent high JML09)を用いて形質転換を行った。

10

*

*【0074】100 μ g/mlのアンピシリン、1 mMのイソプロピルチオ- β -ガラクトシド(IPTG、ナカライテスク社製)、0.7%の5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトシド(X-gal (ナカライテスク社製))を含んだLB寒天培地(1%バクトトリプトン、0.5%イーストエキストラクト、0.5%塩化ナトリウム、1.5%寒天、ギブコ社製)で35℃で16時間培養し、コロニーをカウントした。pUR288にはlacZ遺伝子(β -ガラクトシダーゼ)が存在する。従って、PCR中のDNA合成が正確に行われた場合、上記寒天培地では青いコロニーを形成する。逆にDNA合成中に誤りが起こり、lacZ遺伝子のコードする β -ガラクトシダーゼ活性が低下あるいは欠失した場合、薄い青色ないしは白色のコロニーを形成する。この薄い青コロニーと白コロニーを変異コロニーとして、各酵素を用いた場合の変異率(%)を表1に示した。

【0075】

【表1】

	KOD	IE	ID	IK	IR	rTaq
全コロニー	2394	3267	4869	2826	1197	2831
変異コロニー	19	63	148	362	299	795
変異率(%)	0.78	1.9	3.0	12.8	25.0	28.1

【0076】表1から明らかなように、本発明で得られた改変型耐熱性DNAポリメラーゼIE、ID、IK、IRは、天然型のKODポリメラーゼには劣るものの、Taqポリメラーゼより変異率が低く、すなわちDNA合成の正確性が高かった。

【0077】実施例1

DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR(ヒトゲノム)

改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(DA、EA、DEA、ND、YF)と天然型KODポリメラーゼの混合物を用いてPCRを行った。50 mlの反応液(120mM Tris-HCl (pH8.8 at 25℃), 10mM KCl, 6mM硫酸アンモニウム、1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.1% Triton X-100, 0.001% BSA, 30ngのヒト胎盤由来のゲノムDNA(クローンテック社製)、10ピコモルの配列表11、12記載のプライマー)にNDを2.5単位、KODポリメラーゼを0.05単位加えてPCR反応を行った。サーマルサイクラーはパーキンエルマー社製のモデルPJ2000を用いた。また反応条件は94℃、30秒→68℃、3分を30サイクル行った。比較として改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)、Taqポリメラーゼ(東洋紡製)、市販のDNAポリメラーゼ混合物(ExTaq (宝酒造社製)およびアドバンテージTth(クローンテック社製)も同様にして、PCR反応を行った。ただし、反応液組成は市販品に添付されている緩衝液を用い、ゲノムDNA及びプライマーは全て上記と同量用いた。反応終了後、5 μ lの反応液についてアガロースゲ

ル電気泳動を行い、約4 kbのターゲットの増幅を確認した。図3にアガロースゲル電気泳動の結果を示した。この結果、改変型耐熱性DNAポリメラーゼ(ND)と天然型KODポリメラーゼの混合物を用いて、PCRを行った場合、市販のポリメラーゼ混合物に比べて良好な増幅であった。

【0078】

【発明の効果】本発明では、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性とポリメラーゼ活性の両方を使用することにより、増幅可能な鋳型核酸の長さを大きく増大させることができる。また、熱安定性やDNA合成速度がほぼ同じであって、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のみが異なる2種以上のDNAポリメラーゼの混合物を用いることにより、増幅効率の優れた核酸増幅を行うことができる。

【0079】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 5342

配列の型: 核酸(DNA)

鎖の数: 2本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: genomic DNA

起源: 超好熱始原菌

株名: KOD1

配列の特徴

156-5165 P CDS

40

50

1 3 7 4 - 2 4 5 3	27	介在配列	28	
		配列		
		GCTTGAGGGC CTGCCGTTAT GGGACGTTGC AGTTTGCGCC TACTCAAAGA TGCCGGTTTT	60	
		ATAACGGAGA AAAATGGGGA GCTATTACGA TCTCTCCTTG ATGTGGGGTT TACAATAAAG	120	
		CCTGGATTGT TCTACAAGAT TATGGGGGAT GAAAG ATG ATC CTC GAC ACT GAC	173	
		Met Ile Leu Asp Thr Asp		
		1 5		
		TAC ATA ACC GAG GAT GGA AAG CCT GTC ATA AGA ATT TTC AAG AAG GAA	221	
		Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile Arg Ile Phe Lys Lys Glu		
		10 15 20		
		AAC GGC GAG TTT AAG ATT GAG TAC GAC CGG ACT TTT GAA CCC TAC TTC	269	
		Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg Thr Phe Glu Pro Tyr Phe		
		25 30 35		
		TAC GCC CTC CTG AAG GAC GAT TCT GCC ATT GAG GAA GTC AAG AAG ATA	317	
		Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile Glu Glu Val Lys Lys Ile		
		40 45 50		
		ACC GCC GAG AGG CAC CGG ACG GTT GTA ACG GTT AAG CGG GTT GAA AAG	365	
		Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr Val Lys Arg Val Glu Lys		
		55 60 65 70		
		GTT CAG AAG AAG TTC CTC GCG AGA CCA GTT GAG GTC TGG AAA CTC TAC	413	
		Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val Glu Val Trp Lys Leu Tyr		
		75 80 85		
		TTT ACT CAT CCG CAG GAC GTC CCA GCG ATA AGG GAC AAG ATA CGA GAG	461	
		Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile Arg Asp Lys Ile Arg Glu		
		90 95 100		
		CAT GGA GCA GTT ATT GAC ATC TAC GAG TAC GAC ATA CCC TTC GCC AAG	509	
		His Gly Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr Asp Ile Pro Phe Ala Lys		
		105 110 115		
		CGC TAC CTC ATA GAC AAG GGA TTA GTG CCA ATG GAA GGC GAC GAG GAG	557	
		Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro Met Glu Gly Asp Glu Glu		
		120 125 130		
		CTG AAA ATG CTC GCC TTC GAC ATT GAA ACT CTC TAC CAT GAG GGC GAG	605	
		Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr Leu Tyr His Glu Gly Glu		
		135 140 145 150		
		GAG TTC GCC GAG GCG CCA ATC CTT ATG ATA AGC TAC GCC GAC GAG GAA	653	
		Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile Ser Tyr Ala Asp Glu Glu		
		155 160 165		
		GGG GCC AGG GTG ATA ACT TGG AAG AAC GTG GAT CTC CCC TAC GTT GAC	701	
		Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val Asp Leu Pro Tyr Val Asp		
		170 175 180		
		GTC GTC TCG ACG GAG AGG GAG ATG ATA AAG CGC TTC CTC CGT GTT GTG	749	
		Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys Arg Phe Leu Arg Val Val		
		185 190 195		
		AAG GAG AAA GAC CCG GAC GTT CTC ATA ACC TAC AAC GGC GAC AAC TTC	797	
		Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr Tyr Asn Gly Asp Asn Phe		
		200 205 210		
		GAC TTC GCC TAT CTG AAA AAG CCG TGT GAA AAG CTC GGA ATA AAC TTC	845	
		Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu Lys Leu Gly Ile Asn Phe		
		215 220 225 230		
		CCC CTC GGA AGG GAT GGA ACG GAG CCG AAG ATT CAG AGG ATG GGC GAC	893	

29	30
Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys Ile Gln Arg Met Gly Asp	
235	240 245
AGG TTT GCC GTC GAA GTG AAG GGA CCG ATA CAC TTC GAT CTC TAT CCT	941
Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile His Phe Asp Leu Tyr Pro	
250	255 260
GTG ATA AGA CCG ACG ATA AAC CTG CCC ACA TAC ACG CTT GAG GCC GTT	989
Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr Tyr Thr Leu Glu Ala Val	
265	270 275
TAT GAA GCC GTC TTC GGT CAG CCG AAG GAG AAG GTT TAC GCT GAG GAA	1037
Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu Lys Val Tyr Ala Glu Glu	
280	285 290
ATA ACA CCA GCC TGG GAA ACC GGC GAG AAC CTT GAG AGA GTC GCC GCG	1085
Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn Leu Glu Arg Val Ala Arg	
295	300 305 310
TAC TCG ATG GAA GAT CCG AAG GTC ACA TAC GAG CTT GGG AAG GAG TTC	1133
Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr Glu Leu Gly Lys Glu Phe	
315	320 325
CTT CCG ATG GAG GCC CAG CTT TCT CCG TTA ATC GGC CAG TCC CTC TGG	1181
Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu Ile Gly Gln Ser Leu Trp	
330	335 340
GAC GTC TCC CGC TCC AGC ACT GGC AAC CTC GTT GAG TGG TTC CTC CTC	1229
Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu Val Glu Trp Phe Leu Leu	
345	350 355
AGG AAG GCC TAT GAG AGG AAT GAG CTG GCC CCG AAC AAG CCC GAT GAA	1277
Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala Pro Asn Lys Pro Asp Glu	
360	365 370
AAG GAG CTG GCC AGA AGA CCG CAG AGC TAT GAA GGA GGC TAT GTA AAA	1325
Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr Glu Gly Gly Tyr Val Lys	
375	380 385 390
GAG CCC GAG AGA GGG TTG TGG GAG AAC ATA GTG TAC CTA GAT TTT AGA	1373
Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile Val Tyr Leu Asp Phe Arg	
395	400 405
TGC CAT CCA GCC GAT ACG AAG GTT GTC GTC AAG GGC AAG GGG ATT ATA	1421
Cys His Pro Ala Asp Thr Lys Val Val Val Lys Gly Lys Gly Ile Ile	
410	415 420
AAC ATC AGC GAG GTT CAG GAA GGT GAC TAT GTC CTT GGC ATT GAC GGC	1469
Asn Ile Ser Glu Val Gln Glu Gly Asp Tyr Val Leu Gly Ile Asp Gly	
425	430 435
TGG CAG AGA GTT AGA AAA GTA TGG GAA TAC GAC TAC AAA GGG GAG CTT	1517
Trp Gln Arg Val Arg Lys Val Trp Glu Tyr Asp Tyr Lys Gly Glu Leu	
440	445 450
GTA AAC ATA AAC GGG TTA AAG TGT ACG CCC AAT CAT AAG CTT CCC GTT	1565
Val Asn Ile Asn Gly Leu Lys Cys Thr Pro Asn His Lys Leu Pro Val	
455	460 465 470
GTT ACA AAG AAC GAA CGA CAA ACG AGA ATA AGA GAC AGT CTT GCT AAG	1613
Val Thr Lys Asn Glu Arg Gln Thr Arg Ile Arg Asp Ser Leu Ala Lys	
475	480 485
TCT TTC CTT ACT AAA AAA GTT AAG GGC AAG ATA ATA ACC ACT CCC CTT	1661
Ser Phe Leu Thr Lys Lys Val Lys Gly Lys Ile Ile Thr Thr Pro Leu	
490	495 500

31	32
TTC TAT GAA ATA GGC AGA GCG ACA AGT GAG AAT ATT CCA GAA GAA GAG	1709
Phe Tyr Glu Ile Gly Arg Ala Thr Ser Glu Asn Ile Pro Glu Glu Glu	
505 510 515	
GTT CTC AAG GGA GAG CTC GCT GGC ATA CTA TTG GCT GAA GGA ACG CTC	1757
Val Leu Lys Gly Glu Leu Ala Gly Ile Leu Leu Ala Glu Gly Thr Leu	
520 525 530	
TTG AGG AAA GAC GTT GAA TAC TTT GAT TCA TCC CCG AAA AAA CCG AGG	1805
Leu Arg Lys Asp Val Glu Tyr Phe Asp Ser Ser Arg Lys Lys Arg Arg	
535 540 545 550	
ATT TCA CAC CAG TAT CGT GTT GAG ATA ACC ATT GCG AAA GAC GAG GAG	1853
Ile Ser His Gln Tyr Arg Val Glu Ile Thr Ile Gly Lys Asp Glu Glu	
555 560 565	
GAG TTT AGG GAT CGT ATC ACA TAC ATT TTT GAG CGT TTG TTT GGG ATT	1901
Glu Phe Arg Asp Arg Ile Thr Tyr Ile Phe Glu Arg Leu Phe Gly Ile	
570 575 580	
ACT CCA AGC ATC TCG GAG AAG AAA GGA ACT AAC GCA GTA ACA CTC AAA	1949
Thr Pro Ser Ile Ser Glu Lys Lys Gly Thr Asn Ala Val Thr Leu Lys	
585 590 595	
GTT GCG AAG AAG AAT GTT TAT CTT AAA GTC AAG GAA ATT ATG GAC AAC	1997
Val Ala Lys Lys Asn Val Tyr Leu Lys Val Lys Glu Ile Met Asp Asn	
600 605 610	
ATA GAG TCC CTA CAT GCC CCC TCG GTT CTC AGG GGA TTC TTC GAA GGC	2045
Ile Glu Ser Leu His Ala Pro Ser Val Leu Arg Gly Phe Phe Glu Gly	
615 620 625 630	
GAC GGT TCA GTA AAC AGG GTT AGG AGG AGT ATT GTT GCA ACC CAG GGT	2093
Asp Gly Ser Val Asn Arg Val Arg Arg Ser Ile Val Ala Thr Gln Gly	
635 640 645	
ACA AAG AAC GAG TGG AAG ATT AAA CTG GTG TCA AAA CTG CTC TCC CAG	2141
Thr Lys Asn Glu Trp Lys Ile Lys Leu Val Ser Lys Leu Leu Ser Gln	
650 655 660	
CTT GGT ATC CCT CAT CAA ACG TAC ACG TAT CAG TAT CAG GAA AAT GCG	2189
Leu Gly Ile Pro His Gln Thr Tyr Thr Tyr Gln Tyr Gln Glu Asn Gly	
665 670 675	
AAA GAT CCG AGC AGG TAT ATA CTG GAG ATA ACT GGA AAG GAC GGA TTG	2237
Lys Asp Arg Ser Arg Tyr Ile Leu Glu Ile Thr Gly Lys Asp Gly Leu	
680 685 690	
ATA CTG TTC CAA ACA CTC ATT GGA TTC ATC AGT GAA AGA AAG AAC GCT	2285
Ile Leu Phe Gln Thr Leu Ile Gly Phe Ile Ser Glu Arg Lys Asn Ala	
695 700 705 710	
CTG CTT AAT AAG GCA ATA TCT CAG AGG GAA ATG AAC AAC TTG GAA AAC	2333
Leu Leu Asn Lys Ala Ile Ser Gln Arg Glu Met Asn Asn Leu Glu Asn	
715 720 725	
AAT GGA TTT TAC AGG CTC AGT GAA TTC AAT GTC AGC ACG GAA TAC TAT	2381
Asn Gly Phe Tyr Arg Leu Ser Glu Phe Asn Val Ser Thr Glu Tyr Tyr	
730 735 740	
GAG GGC AAG GTC TAT GAC TTA ACT CTT GAA GGA ACT CCC TAC TAC TTT	2429
Glu Gly Lys Val Tyr Asp Leu Thr Leu Glu Gly Thr Pro Tyr Tyr Phe	
745 750 755	
GCC AAT GGC ATA TTG ACC CAT AAC TCC CTG TAC CCC TCA ATC ATC ATC	2477
Ala Asn Gly Ile Leu Thr His Asn Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile	

33	34
760	765
ACC CAC AAC GTC TCG CCG GAT ACG CTC AAC AGA GAA GGA TGC AAG GAA	2525
Thr His Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu	
775	780
TAT GAC GTT GCC CCA CAG GTC GGC CAC CGC TTC TGC AAG GAC TTC CCA	2573
Tyr Asp Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro	
795	800
GGA TTT ATC CCG AGC CTG CTT GGA GAC CTC CTA GAG GAG AGG CAG AAG	2621
Gly Phe Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys	
810	815
ATA AAG AAG AAG ATG AAG GCC ACG ATT GAC CCG ATC GAG AGG AAG CTC	2669
Ile Lys Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu	
825	830
CTC GAT TAC AGG CAG AGG GCC ATC AAG ATC CTG GCA AAC AGC ATC CTA	2717
Leu Asp Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Ile Leu	
840	845
CCC GAG GAA TGG CTT CCA GTC CTC GAG GAA GGG GAG GTT CAC TTC GTC	2765
Pro Glu Glu Trp Leu Pro Val Leu Glu Glu Gly Glu Val His Phe Val	
855	860
AGG ATT GGA GAG CTC ATA GAC CGG ATG ATG GAG GAA AAT GCT GGG AAA	2813
Arg Ile Gly Glu Leu Ile Asp Arg Met Met Glu Glu Asn Ala Gly Lys	
875	880
GTA AAG AGA GAG GGC GAG ACG GAA GTG CTT GAG GTC AGT GGG CTT GAA	2861
Val Lys Arg Glu Gly Glu Thr Glu Val Leu Glu Val Ser Gly Leu Glu	
890	895
GTC CCG TCC TTT AAC AGG AGA ACT AAC AAG GCC GAG CTC AAG AGA GTA	2909
Val Pro Ser Phe Asn Arg Arg Thr Asn Lys Ala Glu Leu Lys Arg Val	
905	910
AAG GCC CTG ATT AGG CAC GAT TAT TCT GGC AAG GTC TAC ACC ATC AGA	2957
Lys Ala Leu Ile Arg His Asp Tyr Ser Gly Lys Val Tyr Thr Ile Arg	
920	925
CTG AAG TCG GGG AGG AGA ATA AAG ATA ACC TCT GGC CAC AGC CTC TTC	3005
Leu Lys Ser Gly Arg Arg Ile Lys Ile Thr Ser Gly His Ser Leu Phe	
935	940
TCT GTG AGA AAC GGG GAG CTC GTT GAA GTT ACG GGC GAT GAA CTA AAG	3053
Ser Val Arg Asn Gly Glu Leu Val Glu Val Thr Gly Asp Glu Leu Lys	
955	960
CCA GGT GAC CTC GTT GCA GTC CCG CGG AGA TTG GAG CTT CCT GAG AGA	3101
Pro Gly Asp Leu Val Ala Val Pro Arg Arg Leu Glu Leu Pro Glu Arg	
970	975
AAC CAC GTG CTG AAC CTC GTT GAA CTG CTC CTT GGA ACG CCA GAA GAA	3149
Asn His Val Leu Asn Leu Val Glu Leu Leu Leu Gly Thr Pro Glu Glu	
985	990
GAA ACT TTG GAC ATC GTC ATG ACG ATC CCA GTC AAG GGT AAG AAG AAC	3197
Glu Thr Leu Asp Ile Val Met Thr Ile Pro Val Lys Gly Lys Lys Asn	
1000	1005
TTC TTT AAA GGG ATG CTC ACG ACT TTG CGC TGG ATT TTC GGA GAG GAA	3245
Phe Phe Lys Gly Met Leu Arg Thr Leu Arg Trp Ile Phe Gly Glu Glu	
1015	1020
AAG ACG CCC AGA ACC CCG AGA CGC TAT CTC AGG CAC CTT GAG GAT CTG	3293

35	36
Lys Arg Pro Arg Thr Ala Arg Arg Tyr Leu Arg His Leu Glu Asp Leu	
1035 1040 1045	
GGC TAT GTC CGG CTT AAG AAG ATC GGC TAC GAA GTC CTC GAC TGG GAC	3341
Gly Tyr Val Arg Leu Lys Lys Ile Gly Tyr Glu Val Leu Asp Trp Asp	
1050 1055 1060	
TCA CTT AAG AAC TAC AGA AGG CTC TAC GAG GCG CTT GTC GAG AAC GTC	3389
Ser Leu Lys Asn Tyr Arg Arg Leu Tyr Glu Ala Leu Val Glu Asn Val	
1065 1070 1075	
AGA TAC AAC GGC AAC AAG AGG GAG TAC CTC GTT GAA TTC AAT TCC ATC	3437
Arg Tyr Asn Gly Asn Lys Arg Glu Tyr Leu Val Glu Phe Asn Ser Ile	
1080 1085 1090	
CGG GAT GCA GTT GGC ATA ATG CCC CTA AAA GAG CTG AAG GAG TGG AAG	3485
Arg Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Leu Lys Glu Leu Lys Glu Trp Lys	
1095 1100 1105 1110	
ATC GGC ACG CTG AAC GGC TTC AGA ATG AGA AAG CTC ATT GAA GTG GAC	3533
Ile Gly Thr Leu Asn Gly Phe Arg Met Arg Lys Leu Ile Glu Val Asp	
1115 1120 1125	
GAG TCG TTA GCA AAG CTC CTC GGC TAC TAC GTG AGC GAG GGC TAT GCA	3581
Glu Ser Leu Ala Lys Leu Leu Gly Tyr Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Ala	
1130 1135 1140	
AGA AAG CAG AGG AAT CCC AAA AAC GGC TGG AGC TAC AGC GTG AAG CTC	3629
Arg Lys Gln Arg Asn Pro Lys Asn Gly Trp Ser Tyr Ser Val Lys Leu	
1145 1150 1155	
TAC AAC GAA GAC CCT GAA GTG CTG GAC GAT ATG GAG AGA CTC GCC AGC	3677
Tyr Asn Glu Asp Pro Glu Val Leu Asp Asp Met Glu Arg Leu Ala Ser	
1160 1165 1170	
AGG TTT TTC GGG AAG GTG AGG CCG GGC AGG AAC TAC GTT GAG ATA CCG	3725
Arg Phe Phe Gly Lys Val Arg Arg Gly Arg Asn Tyr Val Glu Ile Pro	
1175 1180 1185 1190	
AAG AAG ATC GGC TAC CTG CTC TTT GAG AAC ATG TCC GGT GTC CTA CCG	3773
Lys Lys Ile Gly Tyr Leu Leu Phe Glu Asn Met Cys Gly Val Leu Ala	
1195 1200 1205	
GAG AAC AAG AGG ATT CCC GAG TTC GTC TTC ACG TCC CCG AAA GGG GTT	3821
Glu Asn Lys Arg Ile Pro Glu Phe Val Phe Thr Ser Pro Lys Gly Val	
1210 1215 1220	
CGG CTG GCC TTC CTT GAG GCG TAC TCA TCG CCG ATG CCG ACG TCC ACC	3869
Arg Leu Ala Phe Leu Glu Gly Tyr Ser Ser Ala Met Ala Thr Ser Thr	
1225 1230 1235	
GAA CAA GAG ACT CAG GCT CTC AAC GAA AAG CGA GCT TTA GCG AAC CAG	3917
Glu Gln Glu Thr Gln Ala Leu Asn Glu Lys Arg Ala Leu Ala Asn Gln	
1240 1245 1250	
CTC GTC CTC CTC TTG AAC TCG GTG GGG GTC TCT GCT GTA AAA CTT GCG	3965
Leu Val Leu Leu Leu Asn Ser Val Gly Val Ser Ala Val Lys Leu Gly	
1255 1260 1265 1270	
CAC GAC AGC GGC GTT TAC AGG GTC TAT ATA AAC GAG GAG CTC CCG TTC	4013
His Asp Ser Gly Val Tyr Arg Val Tyr Ile Asn Glu Glu Leu Pro Phe	
1275 1280 1285	
GTA AAG CTG GAC AAG AAA AAG AAC GCC TAC TAC TCA CAC GTG ATC CCC	4061
Val Lys Leu Asp Lys Lys Lys Asn Ala Tyr Tyr Ser His Val Ile Pro	
1290 1295 1300	

37		38
AAG GAA GTC CTG AGC GAG GTC TTT GGG AAG GTT TTC CAG AAA AAC GTC	4109	
Lys Glu Val Leu Ser Glu Val Phe Gly Lys Val Phe Gln Lys Asn Val		
1305 1310 1315		
AGT CCT CAG ACC TTC AGG AAG ATG GTC GAG GAC GGA AGA CTC GAT CCC	4157	
Ser Pro Gln Thr Phe Arg Lys Met Val Glu Asp Gly Arg Leu Asp Pro		
1320 1325 1330		
GAA AAG GCC CAG AGG CTC TCC TGG CTC ATT GAG GGG GAC GTA GTG CTC	4205	
Glu Lys Ala Gln Arg Leu Ser Trp Leu Ile Glu Gly Asp Val Val Leu		
1335 1340 1345 1350		
GAC CGC GTT GAG TCC GTT GAT GTG GAA GAC TAC GAT GGT TAT GTC TAT	4253	
Asp Arg Val Glu Ser Val Asp Val Glu Asp Tyr Asp Gly Tyr Val Tyr		
1355 1360 1365		
GAC CTG AGC GTC GAG GAC AAC GAG AAC TTC CTC GTT GGC TTT GGG TTG	4301	
Asp Leu Ser Val Glu Asp Asn Glu Asn Phe Leu Val Gly Phe Gly Leu		
1370 1375 1380		
GTC TAT GCT CAC AAC AGC TAC TAC GGT TAC TAC GGC TAT GCA AGG GCG	4349	
Val Tyr Ala His Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala		
1385 1390 1395		
CGC TGG TAC TGC AAG GAG TGT GCA GAG AGC GTA ACG GCC TGG GGA AGG	4397	
Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser Val Thr Ala Trp Gly Arg		
1400 1405 1410		
GAG TAC ATA ACG ATG ACC ATC AAG GAG ATA GAG GAA AAG TAC GGC TTT	4445	
Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile Glu Glu Lys Tyr Gly Phe		
1415 1420 1425 1430		
AAG GTA ATC TAC AGC GAC ACC GAC GGA TTT TTT GCC ACA ATA CCT GGA	4493	
Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe Phe Ala Thr Ile Pro Gly		
1435 1440 1445		
CCC GAT GCT GAA ACC GTC AAA AAG AAG GCT ATG GAG TTC CTC AAC TAT	4541	
Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala Met Glu Phe Leu Asn Tyr		
1450 1455 1460		
ATC AAC GCC AAA CTT CCG GCG GCG CTT GAG CTC GAG TAC GAG GCG TTC	4589	
Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu Leu Glu Tyr Glu Gly Phe		
1465 1470 1475		
TAC AAA CGC GGC TTC TTC GTC ACG AAG AAG AAG TAT GCG GTG ATA GAC	4637	
Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys Lys Tyr Ala Val Ile Asp		
1480 1485 1490		
GAG GAA GGC AAG ATA ACA ACG CGC GGA CTT GAG ATT GTG AGG CGT GAC	4685	
Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu Glu Ile Val Arg Arg Asp		
1495 1500 1505 1510		
TGG ACC GAG ATA GCG AAA GAG ACG CAG GCG AGG GTT CTT GAA GCT TTG	4733	
Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala Arg Val Leu Glu Ala Leu		
1515 1520 1525		
CTA AAG GAC GGT GAC GTC GAG AAG GCC GTG AGG ATA GTC AAA GAA GTT	4781	
Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Val		
1530 1535 1540		
ACC GAA AAG CTG AGC AAG TAC GAG GTT CCG CCG GAG AAG CTG GTG ATC	4829	
Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro Pro Glu Lys Leu Val Ile		
1545 1550 1555		
CAC GAG CAG ATA ACG AGG GAT TTA AAG GAC TAC AAG GCA ACC GGT CCC	4877	
His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Lys Ala Thr Gly Pro		

39 40

1560 1565 1570

CAC GTT GCC GTT GCC AAG AGG TTG GCC GCG AGA GGA GTC AAA ATA CGC 4925
His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala Arg Gly Val Lys Ile Arg

1575 1580 1585 1590

CCT GGA ACG GTG ATA AGC TAC ATC GTG CTC AAG GGC TCT GGG AGG ATA 4973
Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu Lys Gly Ser Gly Arg Ile

1595 1600 1605

GGC GAC AGG GCG ATA CCG TTC GAC GAG TTC GAC CCG ACG AAG CAC AAG 5021
Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe Asp Pro Thr Lys His Lys

1610 1615 1620

TAC GAC GCC GAG TAC TAC ATT GAG AAC CAG GTT CTC CCA GCC GTT GAG 5069
Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Val Leu Pro Ala Val Glu

1625 1630 1635

AGA ATT CTG AGA GCC TTC GGT TAC CGC AAG GAA GAC CTG CGC TAC CAG 5117
Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys Glu Asp Leu Arg Tyr Gln

1640 1645 1650

AAG ACG AGA CAG GTT GGT TTG AGT GCT TGG CTG AAG CCG AAG GGA ACT 5165
Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp Leu Lys Pro Lys Gly Thr

1655 1660 1665 1670

TGACCTTTCC ATTTGTTTTT CAGCGGATAA CCCTTTAACT TCCCTTTCAA AAACCTCCCTT 5225
TAGGGAAAGA CCATGAAGAT AGAAATCCGG CGCGGCCCGG TTAAATACGC TAGGATAGAA 5285
GTGAAGCCAG ACCGCAGGGT AGTCGTCACT GCCCGAGGG TTCAACGTTG AGAAGTT 5342

【 0 0 8 0 】配列番号：2

＊トポロジー：直鎖状

配列の長さ：774

配列の種類：蛋白質

配列の型：アミノ酸

*

配列

Met Ile Leu Asp Thr Asp Tyr Ile Thr Glu Asp Gly Lys Pro Val Ile
1 5 10 15
Arg Ile Phe Lys Lys Glu Asn Gly Glu Phe Lys Ile Glu Tyr Asp Arg
20 25 30
Thr Phe Glu Pro Tyr Phe Tyr Ala Leu Leu Lys Asp Asp Ser Ala Ile
35 40 45
Glu Glu Val Lys Lys Ile Thr Ala Glu Arg His Gly Thr Val Val Thr
50 55 60
Val Lys Arg Val Glu Lys Val Gln Lys Lys Phe Leu Gly Arg Pro Val
65 70 75 80
Glu Val Trp Lys Leu Tyr Phe Thr His Pro Gln Asp Val Pro Ala Ile
85 90 95
Arg Asp Lys Ile Arg Glu His Gly Ala Val Ile Asp Ile Tyr Glu Tyr
100 105 110
Asp Ile Pro Phe Ala Lys Arg Tyr Leu Ile Asp Lys Gly Leu Val Pro
115 120 125
Met Glu Gly Asp Glu Glu Leu Lys Met Leu Ala Phe Asp Ile Glu Thr
130 135 140
Leu Tyr His Glu Gly Glu Glu Phe Ala Glu Gly Pro Ile Leu Met Ile
145 150 155 160
Ser Tyr Ala Asp Glu Glu Gly Ala Arg Val Ile Thr Trp Lys Asn Val
165 170 175
Asp Leu Pro Tyr Val Asp Val Val Ser Thr Glu Arg Glu Met Ile Lys
180 185 190

41
 Arg Phe Leu Arg Val Val Lys Glu Lys Asp Pro Asp Val Leu Ile Thr
 195 200 205
 Tyr Asn Gly Asp Asn Phe Asp Phe Ala Tyr Leu Lys Lys Arg Cys Glu
 210 215 220
 Lys Leu Gly Ile Asn Phe Ala Leu Gly Arg Asp Gly Ser Glu Pro Lys
 225 230 235 240
 Ile Gln Arg Met Gly Asp Arg Phe Ala Val Glu Val Lys Gly Arg Ile
 245 250 255
 His Phe Asp Leu Tyr Pro Val Ile Arg Arg Thr Ile Asn Leu Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Thr Leu Glu Ala Val Tyr Glu Ala Val Phe Gly Gln Pro Lys Glu
 275 280 285
 Lys Val Tyr Ala Glu Glu Ile Thr Pro Ala Trp Glu Thr Gly Glu Asn
 290 295 300
 Leu Glu Arg Val Ala Arg Tyr Ser Met Glu Asp Ala Lys Val Thr Tyr
 305 310 315 320
 Glu Leu Gly Lys Glu Phe Leu Pro Met Glu Ala Gln Leu Ser Arg Leu
 325 330 335
 Ile Gly Gln Ser Leu Trp Asp Val Ser Arg Ser Ser Thr Gly Asn Leu
 340 345 350
 Val Glu Trp Phe Leu Leu Arg Lys Ala Tyr Glu Arg Asn Glu Leu Ala
 355 360 365
 Pro Asn Lys Pro Asp Glu Lys Glu Leu Ala Arg Arg Arg Gln Ser Tyr
 370 375 380
 Glu Gly Gly Tyr Val Lys Glu Pro Glu Arg Gly Leu Trp Glu Asn Ile
 385 390 395 400
 Val Tyr Leu Asp Phe Arg Ser Leu Tyr Pro Ser Ile Ile Ile Thr His
 405 410 415
 Asn Val Ser Pro Asp Thr Leu Asn Arg Glu Gly Cys Lys Glu Tyr Asp
 420 425 430
 Val Ala Pro Gln Val Gly His Arg Phe Cys Lys Asp Phe Pro Gly Phe
 435 440 445
 Ile Pro Ser Leu Leu Gly Asp Leu Leu Glu Glu Arg Gln Lys Ile Lys
 450 455 460
 Lys Lys Met Lys Ala Thr Ile Asp Pro Ile Glu Arg Lys Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Tyr Arg Gln Arg Ala Ile Lys Ile Leu Ala Asn Ser Tyr Tyr Gly Tyr
 485 490 495
 Tyr Gly Tyr Ala Arg Ala Arg Trp Tyr Cys Lys Glu Cys Ala Glu Ser
 500 505 510
 Val Thr Ala Trp Gly Arg Glu Tyr Ile Thr Met Thr Ile Lys Glu Ile
 515 520 525
 Glu Glu Lys Tyr Gly Phe Lys Val Ile Tyr Ser Asp Thr Asp Gly Phe
 530 535 540
 Phe Ala Thr Ile Pro Gly Ala Asp Ala Glu Thr Val Lys Lys Lys Ala
 545 550 555 560
 Met Glu Phe Leu Asn Tyr Ile Asn Ala Lys Leu Pro Gly Ala Leu Glu
 565 570 575
 Leu Glu Tyr Glu Gly Phe Tyr Lys Arg Gly Phe Phe Val Thr Lys Lys
 580 585 590

43
 Lys Tyr Ala Val Ile Asp Glu Glu Gly Lys Ile Thr Thr Arg Gly Leu
 595 600 605
 Glu Ile Val Arg Arg Asp Trp Ser Glu Ile Ala Lys Glu Thr Gln Ala
 610 615 620
 Arg Val Leu Glu Ala Leu Leu Lys Asp Gly Asp Val Glu Lys Ala Val
 625 630 635 640
 Arg Ile Val Lys Glu Val Thr Glu Lys Leu Ser Lys Tyr Glu Val Pro
 645 650 655
 Pro Glu Lys Leu Val Ile His Glu Gln Ile Thr Arg Asp Leu Lys Asp
 660 665 670
 Tyr Lys Ala Thr Gly Pro His Val Ala Val Ala Lys Arg Leu Ala Ala
 675 680 685
 Arg Gly Val Lys Ile Arg Pro Gly Thr Val Ile Ser Tyr Ile Val Leu
 690 695 700
 Lys Gly Ser Gly Arg Ile Gly Asp Arg Ala Ile Pro Phe Asp Glu Phe
 705 710 715 720
 Asp Pro Thr Lys His Lys Tyr Asp Ala Glu Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln
 725 730 735
 Val Leu Pro Ala Val Glu Arg Ile Leu Arg Ala Phe Gly Tyr Arg Lys
 740 745 750
 Glu Asp Leu Arg Tyr Gln Lys Thr Arg Gln Val Gly Leu Ser Ala Trp
 755 760 765
 Leu Lys Pro Lys Gly Thr
 770

【 0 0 8 1 】 配列番号 : 3

配列の長さ : 2325

配列の型 : 核酸 (DNA)

* 鎖の数 : 2 本鎖

トポロジー : 直鎖状

* 配列の種類 : genomic DNA

配列

ATGATCCTCG ACGTCTGCTA CATAACCGAG GATGGAAAGC CTGTCATAAG AATTTTCAAG 60
 AAGGAAAACG GCGAGTTTAA GATTGAGTAC GACCGGACTT TTGAACCCTA CTTCTACGCC 120
 CTCCTGAAGG ACGATTCTGC CATTGAGGAA GTCAAGAAGA TAACCGCCGA GAGGCACGGG 180
 ACGGTTGTAA CGGTTAAGCG GGTGAAAAG GTTCAGAAGA AGTTCCTCGG GAGACCAGTT 240
 GAGGTCTGGA AACTCTACTT TACTCATCCG CAGGACGTCC CAGCGATAAG GGACAAGATA 300
 CGAGACCATG GAGCAGTTAT TGACATCTAC GAGTACGACA TACCCTTCGC CAAGCGCTAC 360
 CTCATAGACA AGGGATTAGT GCCAATGGAA GCGGACGAGG AGCTGAAAT CCTCGCCTTC 420
 GACATTCAAA CTCTCTACCA TGAGGGCGAG GAGTTCGCCG AGGGGCCAAT CCTTATGATA 480
 AGCTACGCCG ACGAGGAAGG GGCCAGGGTG ATAACCTGGA AGAACGTGGA TCTCCCTAC 540
 GTTGACGTCG TCTCGACGGA GAGGGAGATG ATAAAGCGCT TCCTCCGTGT TGTGAAGGAG 600
 AAAGACCCCG ACGTTCTCAT AACCTACAAC GCGGACAAC TCGACTTCGC CTATCTGAAA 660
 AAGCGCTGTG AAAAGCTCGG AATAAACTTC GCCCTCGGAA GGGATGGAAG CGAGCCGAAG 720
 ATTCAGAGGA TGGGCGACAG GTTTGCCGTC GAAGTGAAGG GACGGATACA CTTGATCTC 780
 TATCCTGTGA TAAGACGGAC GATAAACCTG CCCACATACA CGCTTGAGGC CGTTTATGAA 840
 GCGCTCTTCG GTCAGCCGAA GGAGAAGGTT TACGCTGAGG AAATAACACC AGCCTCGGAA 900
 ACCGGCGAGA ACCTTGAGAG AGTCGCCCGC TACTCGATGG AAGATGCGAA GGTACATAC 960
 GAGCTTGGGA AGGAGTTCCT TCCGATGGAG GCCCAGCTTT CTCGCTTAAT CGGCCAGTCC 1020
 CTCTGGGACG TCTCCGCTC CAGCACTGCC AACCTCGTTG AGTGGTTCCT CCTCAGGAAG 1080
 GCCTATGAGA GGAATGAGCT GGCCCCGAAC AAGCCCGATG AAAAGGAGCT GGCCAGAAGA 1140
 CGGCAGAGCT ATGAAGGAGG CTATGTAAAA GAGCCCGAGA GAGGGTTGTG GGAGAACATA 1200
 GTGTACCTAG ATTTTAGATC CCTGTACCCC TCAATCATCA TCACCCACAA CGTCTCGCCG 1260
 GATACGCTCA ACAGAGAAGG ATGCAAGGAA TATGACGTTG CCCCACAGGT CGGCCACCGC 1320

45

46

TTCTGCAAGG ACTTCCAGG ATTTATCCCG AGCCTGCTTG GAGACCTCCT AGAGGAGAGG 1380
 CAGAAGATAA AGAAGAAGAT GAAGGCCACG ATTGACCCGA TCGAGAGGAA GCTCCTCGAT 1440
 TACAGGCAGA GGGCCATCAA GATCCTGGCA AACAGCTACT ACGGTACTA CGGCTATGCA 1500
 AGGGCGCGCT GGTACTGCAA GGAGTGTGCA GAGAGCGTAA CCGCCTGGGG AAGGGAGTAC 1560
 ATAACGATGA CCATCAAGGA GATAGAGGAA AAGTACGGCT TTAAGGTAAT CTACAGCGAC 1620
 ACCGACGGAT TTTTGGCCAC AATACCTGGA GCCGATGCTG AAACCGTCAA AAAGAAGGCT 1680
 ATGGAGTTC TCAACTATAT CAACGCCAAA CTTCGGGCGC CGCTTGAGCT CGAGTACGAG 1740
 CGCTTCTACA AACCGCGCTT CTTCGTACCG AAGAAGAAGT ATGCGGTGAT AGACGAGGAA 1800
 CGCAAGATAA CAACCGCGCG ACTTGAGATT GTGAGCGCTG ACTGGAGCGA GATAGCGAAA 1860
 GAGAGCCAGG CGAGCGTTCT TGAAGCTTTG CTAAGGACG GTGACGTGCA GAAGCCCGTG 1920
 AGGATAGTCA AAGAAGTTAC CGAAAAGCTG AGCAAGTACG AGTTTCCGCC CGAGAAGCTG 1980
 GTGATCCACG AGCAGATAAC GAGGGATTTA AAGGACTACA AGGCAACCGG TCCCCACGTT 2040
 GCGGTTGCCA AGAGTTTGGC CGCGAGAGGA GTCAAATAC GCCCTGGAAC CGTGATAAGC 2100
 TACATCGTGC TCAAGGCTC TGGGAGGATA GCGACACGG CGATACGTT CGACGAGTTC 2160
 GACCCGCGA AGCACAAGTA CGACGCCGAG TACTACATTG AGAACCAGGT TCTCCAGGCC 2220
 GTTGAGAGAA TTCTGAGAGC CTTCGGTTAC CGCAAGGAAG ACCTGCGCTA CCAGAAGACG 2280
 AGACAGGTTG GTTTGAGTGC TTGCTGAAG CCGAAGCGAA CTTGA 2325

【0082】配列番号:4

配列の長さ:24

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

CTTTGCTCA GATCTTCTTT CCTG 24

【0083】配列番号:5

配列の長さ:36

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

CAGGAAAGAA GATCTGAGCA AAAG 24

【0084】配列番号:6

配列の長さ:36

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

CTGAAAATGC TCGCCTTCGC GATTGCAACT CTCTAC 36

【0085】配列番号:7

配列の長さ:33

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

CTGAAAATGC TCGCCTTCGC GATTGAAACT CTCT 34

【0086】配列番号:8

配列の長さ:30

配列の型:核酸(DNA)

20 鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

GCCCTCGTG TAGAGAGTTG CAATGTCGAA 30

【0087】配列番号:9

配列の長さ:32

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

30 配列の種類:合成DNA

配列

CGGACGTACT GATAACGTAC GACCGTGACA AC 32

【0088】配列番号:10

配列の長さ:33

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

40 CCTTGAGAGA GTCGCGCGCT TCTCGATGGA AGA 33

【0089】配列番号:11

配列の長さ:35

配列の型:核酸(DNA)

鎖の数:1本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:合成DNA

配列

TGGCTAGCCA AGGAACCACC AGTTGATTAG CAGAG 35

【0090】配列番号:12

50 配列の長さ:35

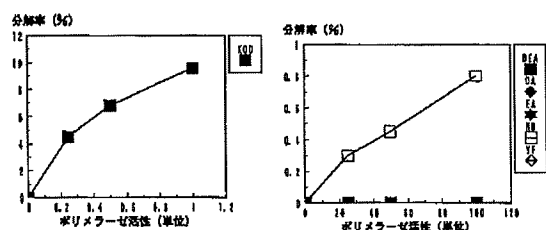
47

配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
配列
ATAAGAGGTC CCAAGACTTA GTACCTGAAG GGTGA 36
【0091】配列番号：13
配列の長さ：24
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
配列
CGCCAGGGTT TTCCAGTCA CGAC 24
【0092】配列番号：14
配列の長さ：24
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
CTTTGCTCA GATCTCTTT CCTG 24
【0093】配列番号：15
配列の長さ：36
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AGCTGAAAT GCTAGCCTTC GACAATGAAA CTCTCT 36
【0094】配列番号：16
配列の長さ：36
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AGCTGAAAT GCTAGCCTTC GACGAAGAAA CTCTCT 36
【0095】配列番号：17
配列の長さ：33
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
GAAATGCTC GCCTTTGATC AAGAACTCT CTA 33
【0096】配列番号：18
配列の長さ：36
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AGCTGAAAT GCTAGCCTTC GACGATGAAA CTCTCT 36

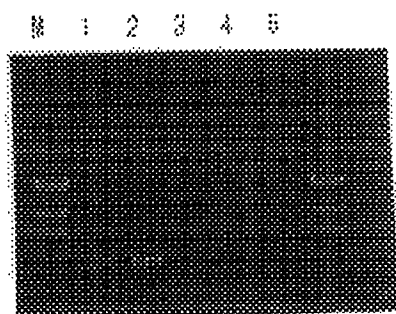
特開平10-42874
48

【0097】配列番号：19
配列の長さ：30
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
CGCCTTCGAC ATTGAAGTAC TCTACCATGA 30
【0098】配列番号：20
配列の長さ：36
10 配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AGCTGAAAT GCTAGCCTTC GACAGAGAAA CTCTCT 36
【0099】配列番号：21
配列の長さ：36
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
20 配列の種類：合成DNA
AGCTGAAAT GCTAGCCTTC GACAAAGAAA CTCTCT 36
【0100】配列番号：22
配列の長さ：35
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AAAAAGTACT CACCAAGTC AGAAAAGCAT CTTAC 35
【0101】配列番号：23
30 配列の長さ：34
配列の型：核酸（DNA）
鎖の数：1本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：合成DNA
AAAAAGTACT CAACCAAGTC ATTCVTGAGA ATAGT 34
【図面の簡単な説明】
【図1】改変型DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNA分解率を示す図である。
【図2】改変型DNAポリメラーゼの熱安定性を示す図である。
40 【図3】DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR（ヒトゲノム）の結果を示す図である。
【図4】耐熱性DNAポリメラーゼのエキソ（EXO）領域のアミノ酸配列を示す図である。
【図5】改変型DNAポリメラーゼのポリメラーゼ活性とDNA分解率を示す図である。
【図6】天然型KODポリメラーゼとのエキソヌクレアーゼ活性の比率を示す図である。

【図1】

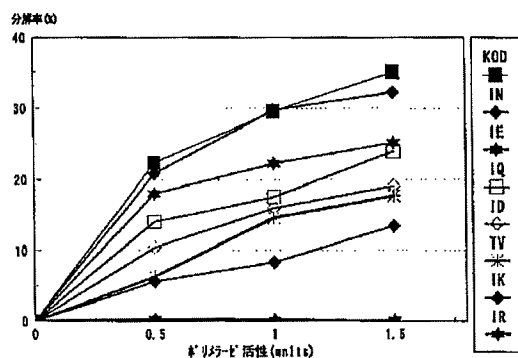


【図3】

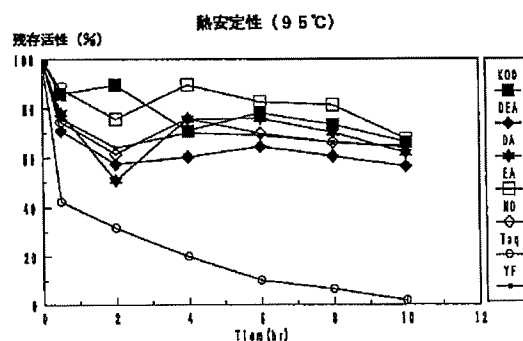


Lane 1: NO
 2: NO+KOD
 3: Advantage Thmix (和-テック社製)
 4: Ex Taq (和社製)
 5: Taq (東洋紡製)
 M: A HindIII7-カ

【図5】



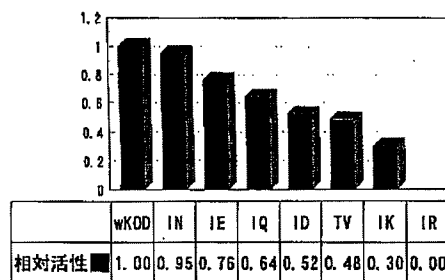
【図2】



【図4】

	EXO I	EXO II	EXO III
KOD	MLAFDITLY	LITTYGDNPDFAYLKRR	VAKYSMEDAKV
Pfu	ILAFDITLY	ITTYGDSFDFPYLAKR	VAKYSMEDAKA
Vent	LLAFDITFY	ITTYGDNFDPYLYKK	VAKYSMEDAKA
Deep Vent	LLAFDITLY	ITTYGDSFDPYLPKR	VAKYSMEDAKV

【図6】



【手続補正書】

【提出日】平成8年9月2日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図3

*【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】 DNAポリメラーゼ組成物を用いたPCR

* (ヒトゲノム)の結果を示す電気泳動の写真である。

フロントページの続き

(72)発明者 川上 文清

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 川村 良久

福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株

式会社敦賀バイオ研究所内

(72)発明者 高木 昌宏

大阪府吹田市青山台1-3 C-58-207

(72)発明者 今中 忠行

大阪府吹田市藤白台2丁目28番11号